

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Rostliny jako zdroje kumarinů

Plants as source of coumarins

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Barbora Staszková

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Barbora Staszková

PODĚKOVÁNÍ

„Tímto bych velice ráda poděkovala PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a příjemnou spolupráci při sestavování této diplomové práce. Zároveň děkuji také své rodině a přátelům, kteří mě během psaní i celého studia neustále podporovali.“

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE.....	7
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Charakteristika a výskyt kumarinů	8
3.2 Chemická struktura a klasifikace.....	9
3.3 Biosyntéza	12
3.4 Farmakologické vlastnosti a využití	14
3.5 Kumariny v rostlinách čeledi Apiaceae.....	14
3.5.1 Ammi visnaga	15
3.5.2 Angelica archangelica.....	16
3.5.3 Angelica lucida	18
3.5.4 Angelica sinensis	19
3.5.5 Torilis leptophylla.....	20
3.5.6 Rostliny rodu Ferula a Ferulago	21
3.6 Kumariny v rostlinách čeledi Asteraceae	23
3.6.1 Hieracium pilosella	24
3.6.2 Artemisia capillaris	25
3.7 Kumariny v rostlinách čeledi Fabaceae.....	26
3.7.1 Dipteryx odorata	26
3.7.2 Melilotus officinalis.....	27
3.7.2 Glycyrrhiza glabra	29
3.8 Kumariny v rostlinách čeledi Rutaceae	30

3.8.1 <i>Aegle marmelos</i>	30
3.8.2 <i>Clausena excavata</i>	33
3.8.3 <i>Zanthoxylum schinifolium</i>	35
3.9 Kumariny v rostlinách čeledí Moraceae, Hippocastanaceae, Rubiaceae a Thymelaeaceae	37
3.9.1 <i>Ficus carica</i>	37
3.9.2 <i>Aesculus hippocastanum</i>	39
3.9.3 <i>Galium odoratum</i>	40
3.9.4 <i>Daphne cneorum</i>	40
3.10 Kumariny produkované mikroorganismy	42
4. DISKUZE A ZÁVĚR	43
5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	45
6. REJSTŘÍK	46
7. ABSTRAKT	48
8. ABSTRACT	49
9. LITERATURA	50

1. ÚVOD

Rostlinná říše představuje pro člověka důležitý zdroj kyslíku, obživy a materiálu pro využití např. v textilním či stavebním průmyslu. Mimo to je významná také díky produkci širokého spektra organických látek, známých jako tzv. sekundární metabolity. Tyto látky, které nejsou přímo zahrnuty do procesu růstu, vývoje či rozmnožování rostliny, se vyznačují pestrou škálou účinků, pro něž jsou vyhledávány v rámci prevence i terapie mnoha zdravotních potíží a onemocnění.

Mezi sekundární metabolity řadíme také kumariny, jimž je věnována tato diplomová práce. Patří mezi relativně jednoduché sloučeniny s účinky na oběhový, trávicí či imunitní systém. Nacházejí se v mnoha druzích rostlin, jednoletých, dvouletých i vytrvalých, rostoucích jak u nás, tak v oblastech tropických a subtropických. Tyto rostliny se často využívají v tradiční lidové medicíně. Vlastnosti, pro něž se uplatňují, mnohdy souvisí právě s přítomností kumarinů.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je shrnout současný stav poznání o rostlinných sekundárních metabolitech, kumarinech.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika a výskyt kumarinů

Kumariny, deriváty laktonu *o*-hydroxyskořicové kyseliny, patří mezi obsahové látky rostlin, takzvané sekundární metabolity.^[1]

Základní sloučeninou je *kumarin*, který byl poprvé roku 1820 izolován z plodů brazilské dřeviny silovoně vonné (*Dipteryx odorata*, Fabaceae). Její plody, známé jako tonkové boby, bývají v zemi původu lidově nazývány „coumarou“, odkud také vzniklo pojmenování pro tuto nově objevenou látku a posléze celou skupinu.

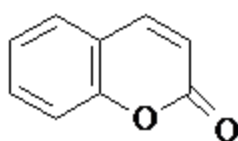
Do dnešní doby bylo popsáno několik tisíc derivátů, přičemž nejjednodušší z nich jsou široce rozšířené v celé rostlinné říši. Typické jsou zejména pro čeledi Apiaceae, Fabaceae nebo Poaceae. Složitější struktury lze nalézt v čeledích Asteraceae či Rutaceae.^[2]



Obr. 1: Tonkové boby ^[34]

3.2 Chemická struktura a klasifikace

Společným znakem všech kumarinů je *2H*-1-benzopyran-2-onový skelet. Tento je, až na několik vzácných případů včetně *kumarinu* samotného, substituován hydroxylovou skupinou v poloze 7. Jejími úpravami, např. methylací, cyklizací nebo vytvořením glykosidické vazby, vzniká celá řada derivátů.^[2]

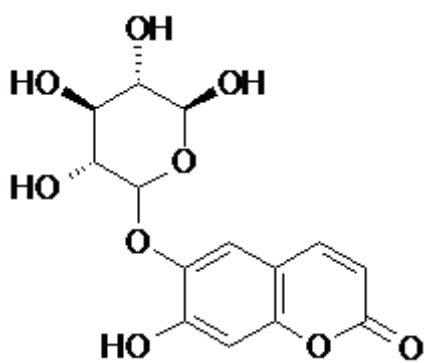


kumarin

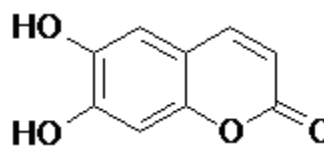
Obr. 2: Struktura kumarinu

Všechny tyto látky můžeme rozdělit do tří základních skupin.

První tvoří kumariny klasické, kam řadíme *kumarin* a další jednoduché struktury jako *umbeliferon*, *eskulin* nebo *eskuletin*. Dnes je známo více než 700 sloučenin tohoto typu, hojně zastoupených v mnoha druzích rostlin.^[3]



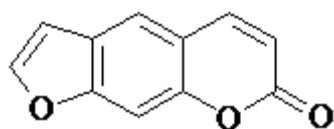
eskulin



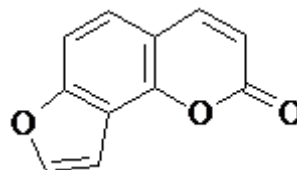
eskuletin

Obr. 3: Struktura eskulinu a eskuletinu

Druhou skupinou jsou takzvané furanokumariny, které mají k aromatické části připojený furanový kruh. Vyskytovat se mohou jako lineární nebo méně často jako angulární. Mezi zástupce lineárních patří mimo jiné *psoralen*, *imperatorin* či *xanthotoxin*, k angulárním pak *angelicin* nebo *pimpinelin*.^[3]



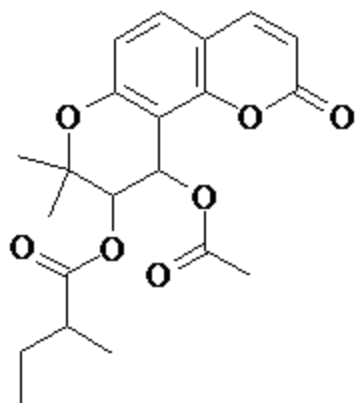
psoralen



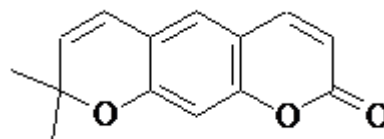
angelicin

Obr. 4: Struktura furanokumarinů psoralenu a angelicinu

Obdobně jako furanokumariny mají i pyranokumariny přikondenzovaný aromatický kruh, tentokrát pyranový. Stejně tak mohou existovat v lineární i angulární formě. Příkladem této poslední skupiny derivátů může být angulární *xanthyletin* nebo lineární *visnadin*.^[3]



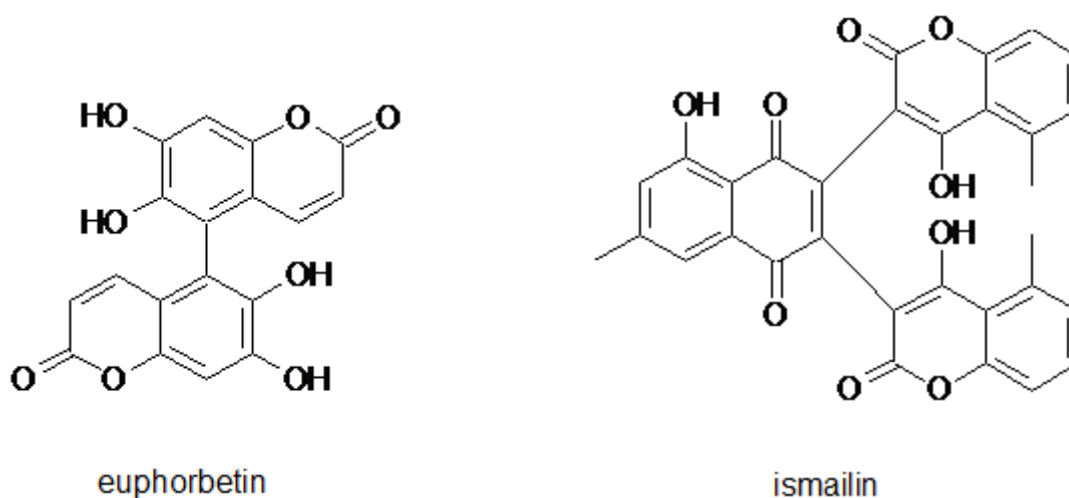
xanthyletin



visnadin

Obr. 5: Struktura pyranokumarinů xanthyletinu a visnadinu

Mimo tyto tři základní typy se v rostlinné říši můžeme setkat také s dimery a trimery kumarinů označovanými jako bikumariny, v případě trimerů trikumariny. Jedná se o různým způsobem spojené kumarinové jednotky. Nejčastější spojení tvoří jednoduchá vazba mezi uhlíky příslušných jednotek nebo etherový můstek. Výjimkou však nejsou ani složitější sloučeniny vzájemně vázané přes orthoesterovou skupinu (spirobikumariny) či přes 7-methyljuglon.^[4]



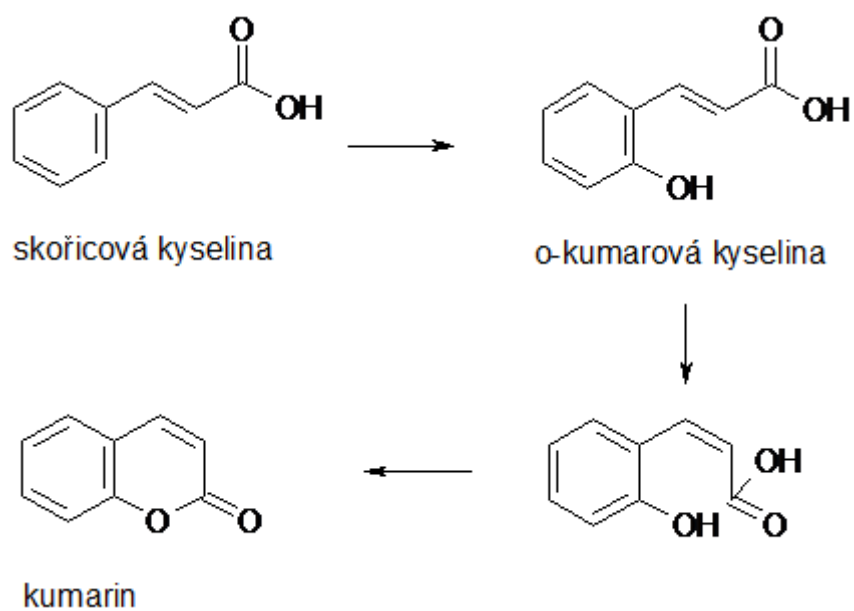
Obr. 6: Struktura bikumarinů euphorbetinu a ismailinu

3.3 Biosyntéza

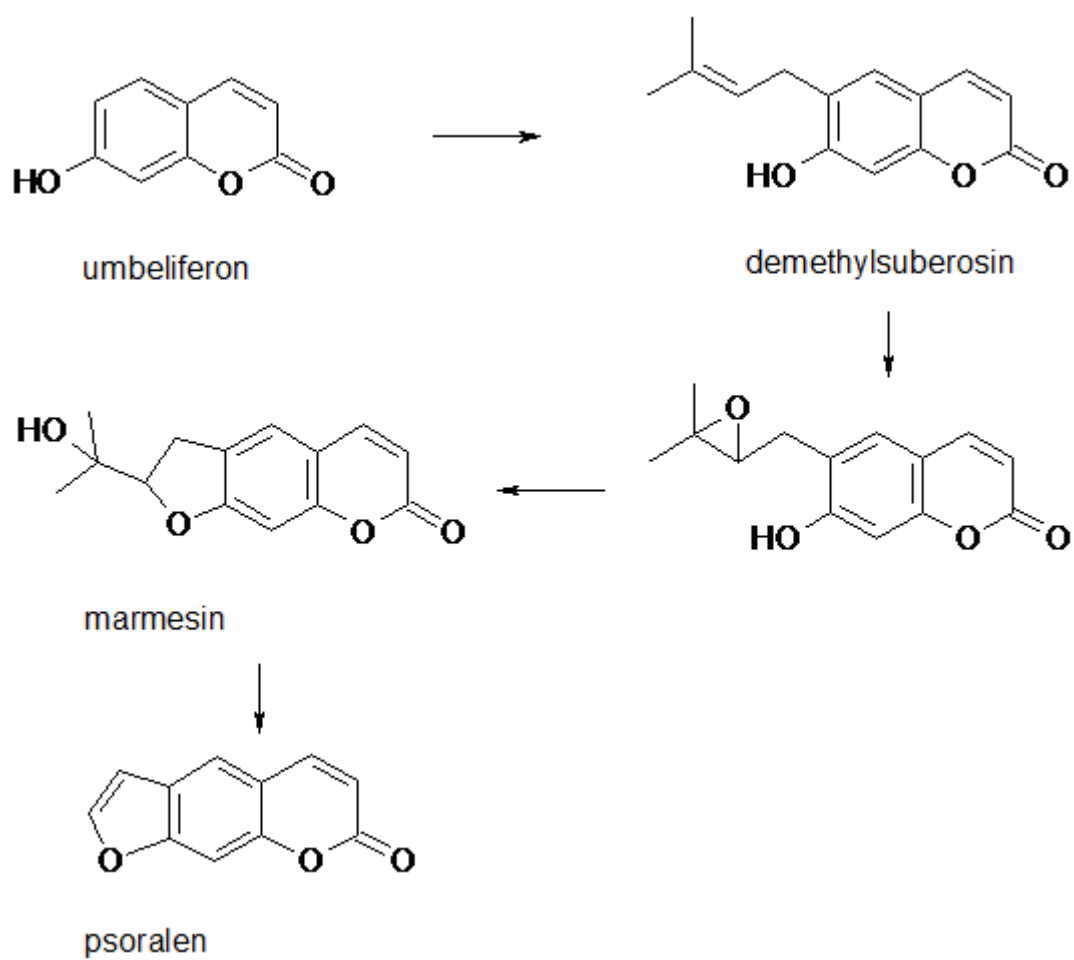
Stejně jako u ostatních fenyylpropanoidů vychází struktura kumarinů z kyseliny skořicové. Ta je nejdříve hydroxylována v *ortho* poloze vzhledem k uhlíkatému řetězci za vzniku kyseliny *o*-kumarové. Tento zásadní krok syntézy je následován izomerizací dvojné vazby uhlíkatého řetězce z *trans* formy na *cis* formu za katalýzy světlem. Poslední fází je spontánní laktonizace, která vede ke vzniku kumarinu. V některých vzácných případech se glykosidací skořicové kyseliny laktonizaci zabrání. Kumarin poté vzniká pouze poškozením epitelu rostliny a enzymatickou hydrolýzou.^[2]

U *7-hydroxykumarinu* neboli *umbeliferonu* předchází *ortho*-hydroxylaci hydroxylace v poloze *para*. Výchozí látkou je tak kyselina *p*-kumarová. Obdobně vznikají i ostatní deriváty. K jejich syntéze se využívá např. kyselina kávová či ferulová.^[3]

Z hlediska tvorby složitějších kumarinů s přikondenzovaným kruhem je důležitou látkou výše zmíněný *umbeliferon*. Jeho prenylace dimethylallylpyrofosfátem (=DMAPP) v poloze 6 dává vzniknout lineárním furano- a pyranokumarinům, v poloze 8 angulárním. Nukleofilním atakem hydroxyly v poloze 7 na epoxid utvořený oxidací dvojné vazby isopentenylového řetězce dojde k cyklizaci. Výsledný produkt závisí na orientaci nukleofilního ataku. Vzniknout může hydroxyisopropyldihydrofuranokumarin nebo hydroxydimethyldihydropyranokumarin v případě ataku na terciární uhlík. Přirozený výskyt látek jako je (+)-(*R*)-*lomatina* a (+)-(*S*)-*columbianin* tuto hypotézu potvrzuje.^[2]



Obr. 7: Základní schéma syntézy kumarinu



Obr. 8: Syntéza furanokumarinu psoralenu

3.4 Farmakologické vlastnosti a využití

Ačkoli je množství drog obsahujících kumariny velké, farmakologický zájem o ně je značně omezen. Je to dáno především jejich toxicitou a nežádoucími vedlejšími účinky. Z tohoto důvodu se většinou jedná o drogy neoficinální. Mnoho z nich ale našlo místo v tradiční lidové medicíně. Přímý vztah mezi přítomností kumarinů a účinky, pro které se používají, nebyl však vždy zcela prokázán.^[2]

Farmakologické a biochemické vlastnosti, kterými se jednotlivé látky prezentují a díky nimž se v terapii mohou uplatnit, závisí na charakteru substituce aromatického jádra.^[5]

Jednou z významných oblastí působení je cévní a lymfatický systém. Včetně zvýšené lomivosti kožních kapilár bývají indikovány pro léčbu žilní nedostatečnosti či akutní projevy hemoroidů (např. *eskulin*, *eskuletin*).

Neméně důležitý je jejich stimulující vliv na systém imunitní, kde pomáhají potlačit alergickou reakci a zabraňují rozvoji zánětu.

Pozorovány byly také fotosenzitivní vlastnosti některých furanokumarinů, jichž se využívá v terapii kožních onemocnění jako je lupénka či vitiligo (např. *bergapten*).

Několik látek bylo rovněž zkoumáno a prošlo klinickými studiemi u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním (např. *kumarin*, *nordentatin*).^[2,5,6]

Tyto a další účinky přirozeně se vyskytujících kumarinů budou blíže popsány u jednotlivých zástupců v následujících kapitolách.

3.5 Kumariny v rostlinách čeledi Apiaceae

Čeleď Apiaceae je čeledí zahrnující přes 2800 druhů rostlin z více než 270 rodů. Jedná se o jednoleté až vytrvalé byliny, obvykle aromatické, obsahující široké spektrum látek, z nichž nejvíce charakteristické a rozpoznatelné jsou právě kumariny.^[1,7,8]

3.5.1 *Ammi visnaga*

Název: *Ammi visnaga* (pakmín visnaga, morač zákrovnatý)

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Ammi visnaga, českým názvem pakmín visnaga nebo morač zákrovnatý, je jednoletá bylina pocházející ze Středomoří a oblastí severní Afriky a Blízkého východu. Plody této rostliny jsou dvojnažky, podle Německého lékopisu 2010 považovány za oficiální.

Mezi obsahové látky drogy, které byly doposud identifikovány, patří mimo jiné angulární pyranokumariny *visnadin*, *samidin* a *dihydrosamidin*.

V případě prvního ze jmenovaných byla v pokusech *in vitro* prokázána jeho schopnost blokovat vápníkové kanály. Z tohoto důvodu působí *visnadin* jako koronární vasodilatátor s pozitivně inotropním, bradykardickým a spasmolytickým účinkem.^[2] Koronární i periferní vasodilatační aktivitu potvrdily i studie prováděné na hladké svalovině cév izolovaných z krys.^[9] Díky těmto vlastnostem se *visnadin* může uplatnit při léčbě cévních onemocnění jako je angina pectoris. Propagován je také jeho příznivý vliv na senilní mozkovou nedostatečnost.

Kromě zmíněných pyranokumarinů obsahují plody některých dalších druhů morače také lineární furanokumariny. Jako příklad lze uvést *xanthotoxin* získaný z morače většího (*Ammi majus*, Apiaceae).

Bylo zjištěno, že kontakt s touto rostlinou či jejími produkty a následné vystavení se slunečnímu záření může vyvolat akutní dermatitidu projevující se tvorbou puchýřků, mnohdy se spojujících ve velké puchýře. Jedná se o projev fototoxicity zmíněného kumarinu. Ačkoli přesný mechanismus působení není zcela objasněn, předpokládá se, že tyto vlastnosti souvisí s jejich schopností tvořit vazby s pyrimidinovými bázemi nukleových kyselin. Následná porucha v genomu tak může odrážet nejen mutagenní a karcinogenní vlastnosti, ale i výše uvedenou kožní reakci.

V případě absence specifické léčby je na místě mírnit projevy dermatitidy chladivými obklady. Možná je také aplikace protizánětlivých kortikosteroidů.^[2]

3.5.2 *Angelica archangelica*

Název: *Angelica archangelica* (andělíka lékařská)

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Významným zástupcem čeledi Apiaceae je andělíka lékařská. Původem je tato dvouletá až víceletá mohutná bylina z oblastí severovýchodní Evropy, ale hojně využívaná je i v celé Asii.^[1,2,10]

Podle Českého lékopisu 2009 i aktuálního Francouzského lékopisu jsou officinální drogou sušené kořeny. Obsahují až 6 ml/kg esenciálních olejů bohatých na uhlovodíkové sloučeniny. Mimo to jsou charakteristické širokou škálou jednoduchých, lineárních, angulárních, furano- a hydroxyisopropylfuranokumarinů. Nejznámější z nich je *osthol*, *bergapten*, *angelicin*, *archangelicin*, ale také *xanthotoxin*, jehož vlastnosti byly popsány v rámci předešlého rostlinného druhu. Kumariny *bergapten* a *osthol* uvádí Český lékopis a jeho Doplněk 2013 v rámci kapitoly Zkoumadla.^[11,12]

Na základě tradice se kořeny andělíky, stejně jako její plody, uplatňují v léčbě příznaků gastrointestinálních poruch. Podávány perorální cestou ulevují od nadýmání či plynatosti. Využívány jsou také při poruchách trávení a nadměrném říhání. Jako doplňkové látky se využívají při léčbě bolestí vzniklých při gastrointestinálním stresu.

Jelikož jsou furanokumariny považovány za fototoxické sloučeniny, doporučuje se pacientům během léčby těmito látkami dlouhodobě nevystavovat slunečnímu nebo UV záření. Fotodynamických vlastností *bergaptenu* lze však využít v terapii lupénky a jiných dermatologických onemocnění. Po perorální aplikaci tohoto furanokumarinu v dávkách okolo 1,2 mg/kg se v 2 – 3 hodinovém odstupu vystaví pacienti UV záření o vlnové délce 320 – 380 nm nebo záření UVA. V případě UVA záření jsou dávky zpočátku 1 – 3 J/cm² a postupně se zvyšují na 6 – 8 J/cm². U léčených s těžkou lupénkou se první výsledky dostavují zpravidla po 20 sezeních. Pro pacienty s poruchami jater je možná i léčba lokální, ale musí být provedena s nejvyšší

opatrností. Naopak kontraindikována je u těhotných žen, dětí, pacientů s renální a srdeční nedostatečností a v případě kožních onemocnění zhoršujících se na slunci.

I při dodržení všech postupů a doporučení není tato léčba zcela bez rizika. Je proto nutné, aby se při výskytu suché kůže, pálení nebo svědění těmto nežádoucím projevům zabránilo nošením ochranných oděvů. Důležité jsou také sluneční brýle s ochranným filtrem, a to zejména v průběhu terapie a následujících hodinách. Zamezí se tak zrychlenému stárnutí oční čočky. Studie prováděné v 90. letech rovněž potvrdily, že dlouhodobá léčba zvyšuje nebezpečí vzniku melanomu nebo karcinomu i několik let od začátku terapie. Experti se však domnívají, že pokud se omezí počet indikací, zvýší se ochrana kůže, stanoví počet sezení a maximální podaná dávka na 1500 J/cm^2 , zůstane léčba užitečná. Zlepšení kvality života je pak obzvláště patrné u pacientů s rozsáhlou lupénkou.^[2]



Obr. 9: *Angelica archangelica* ^[35]

3.5.3 *Angelica lucida*

Název: *Angelica lucida*

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Vzhledově podobný ostatním zástupcům rodu *Angelica* je druh s latinským názvem *Angelica lucida*. Pro místo svého častého výskytu bývá tato bylina běžně označována jako pobřežní. Rozšířená je podél východní i západní strany Severní Ameriky a v některých částech východní Asie.

Měkké části rostliny používali Eskymáci jako potravu a zároveň jako prostředek proti bolesti a nachlazení. K prevenci nemoci pak byly využívány především mladé stonky a kořeny.

První fytochemické zkoumání plodů *Angelica lucida* vedlo k izolaci a charakterizaci pěti známých furanokumarinů – *imperatorinu*, *isoimperatorinu*, *heraclenolu*, *oxypeucedanin hydrátu* a *heracleninu*. Všechny složky byly identifikovány prostřednictvím chromatografických metod a dostupné literatury. Přítomnost kumarinů, známých pro své široké farmakologické vlastnosti, je pro rod *Angelica* typická a tedy velmi dobře zdokumentována. Izolované kumariny tak byly už dříve popsány u mnoha dalších druhů rodu, s výjimkou *heracleninu*, který byl doposud identifikován jen u *Angelica ursine*, *Angelica genuflexa* a *Angelica silvestris*. Kumarin *imperatorin* uvádí jako zkoumadlo Doplněk 2013 aktuálního lékopisu.^[12]

Kromě charakterizace získaných látek byly tyto podrobeny testování jejich antimikrobiální aktivity agarovou diluční metodou. Zvolenými kmeny pro tuto zkoušku byly dvě grampozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), čtyři gramnegativní bakterie (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), tři patogenní houby (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*) a v neposlední řadě také orální patogeny *Streptococcus mutans* a *Streptococcus viridans*.

Všech pět kumarinů prokázalo inhibiční vlastnosti s MIC hodnotami v rozmezí 0,012 – 0,85 mg/ml u většiny testovaných mikrobů. Největší účinek byl pak zaznamenán zejména u prvních dvou jmenovaných, *imperatorinu* a *isoimperatorinu*. Pravděpodobnou příčinou je podle

dosavadních zkoumání přítomnost isoprenylové skupiny připojené ke karbocyklickému kruhu. V případě hub z rodu *Candida* byly všechny izolované složky neaktivní. Vysokou odolnost vůči působení kumarinů projevila, v souladu s již dříve prováděnými studiemi, také gramnegativní *Pseudomonas aeruginosa*. Ostatní gramnegativní i grampozitivní bakterie ukázaly během testování stejnou citlivost.

Vzhledem k tomu, že mechanismus antimikrobiálního účinku zmíněných kumarinů spočívá především v inhibici syntézy bakteriální nukleové kyseliny, je možné zvýšením lipofility dané molekuly usnadnit její přestup přes membránu na místo účinku. Jednou z možností je adice prenylové skupiny na furanokumarinový skelet.^[8]

3.5.4 *Angelica sinensis*

Název: *Angelica sinensis* (děhel čínský)

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Pro své významné postavení v tradiční čínské medicíně (TČM) stojí za zmínku andělíka čínská, vytrvalá bylina pocházející z Číny. Její kořen je oficiální drogou uvedenou v Evropském, Britském i aktuálním Českém lékopise. Přípravky s extraktem z tohoto kořene byly navíc schváleny Evropskou lékovou agenturou (EMA), jejímž hlavním úkolem je ochrana a podpora veřejného zdraví prostřednictvím hodnocení a kontroly léčivých přípravků pro humánní a veterinární použití. K hlavním účinkům drogy podle teorie TČM patří aktivace krevního oběhu, relaxace střev a u žen také regulace menstruačního cyklu. Indikována je rovněž při anémiích spojených se závratěmi a bušením srdce, zácpě, traumatických poraněních, hnisavých onemocněních kůže a vředech.

Charakteristickými složkami, které byly doposud izolovány, jsou mimo jiné jednoduché kumariny *angelol G*, *angelicon*, *umbeliferon*, *skopoletin*, *6-ethoxykumarin*, *osthol* a furanokumariny *imperatorin*, *psoralen*, *oxypeucedanin* a *bergapten*. *Umbeliferon* a *skopoletin* patří mezi zkoumadla uvedená v Českém lékopisu a Doplnku 2013.^[11,12]

Přítomnost zmíněných furanokumarinů může být pro člověka nebezpečná z hlediska možné fotosenzitivity, kterou mohou vyvolat. V kombinaci s UV zářením jsou považovány za karcinogenní. Je proto potřeba stanovit jejich množství v droze, aby nedocházelo k překročení denního příjmu těchto látek.

U všech izolovaných složek byla provedena analýza zaměřená na serotonergní aktivitu. Z kumarinů vykazoval afinitu k 5-HT₇ receptorům (serotoninové receptory) v testu kompetitivní vazby *imperatorin*. Působení na tento typ receptorů vede ke zlepšení nálady, chování a ke zmírnění návalů horka u žen před menstruací a v menopauzálním období.^[13]

3.5.5 *Torilis leptophylla*

Název: *Torilis leptophylla*

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Neméně zajímavou rostlinou z hlediska obsahu kumarinů i jejich vlastností je bylina původem z Evropy, Asie a severní Afriky, *Torilis leptophylla*.

Stejně jako předchozí druhy má i tato rostlina tradiční využití. V oblastech okolo Íránu a Pákistánu je to především léčba gastrointestinálních onemocnění. Vysoká účinnost byla zaznamenána také vůči některým patogenům, což podporuje její užití jako dezinfekčního a antiseptického prostředku.

Fytochemickým výzkumem methanolového extraktu rostliny byla zjištěna přítomnost širokého spektra látek, mezi nimiž nechyběly ani kumariny. Jejich výskyt potvrdila reakce methanolového extraktu s filtračním papírem navlhčeným hydroxidem sodným, který pod UV lampou žlutě fluoreskoval. Schopnost fluoreskovat po ozáření UV světlem je pro kumariny typická a z analytického hlediska tedy významná.^[14,15]

Methanolvý extrakt byl také podroben testování antioxidační aktivity. Použito bylo několik různých technik prováděných *in vitro*, ale také metod *in vivo* s použitím jaterní tkáně krys. Výsledky studie naznačily, že tento extrakt může být díky schopnosti vylučovat volné radikály

užitečný např. při obraně proti poškození jater vyvolané tetrachlormethanem. Nahrazení syntetických antioxidantů přírodními je výhodné i z hlediska dopadů na lidské zdraví.^[14]



Obr. 10: *Torilis leptophylla* ^[36]

3.5.6 Rostliny rodu *Ferula* a *Ferulago*

Název: *Ferula communis* (ločidlo obecné)

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Název: *Ferula glauca*

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Název: *Ferulago campestris*

Čeleď: Apiaceae (miříkovité)

Rostliny z rodu *Ferula* jsou jednoleté až víceleté mohutné byliny rostoucí převážně v oblasti Středomoří. Po morfologické i fytochemické stránce odpovídá těmto rostlinám také *Ferulago campestris*, zástupce rodu *Ferulago*.

Významnými složkami, izolovanými z podzemních částí všech tří druhů, jsou mimo jiné kumariny. Jejich struktura byla objasněna pomocí 1D a 2D NMR a hmotnostního spektra. Všechny byly podrobeny zkoušce na antimikrobiální aktivitu a aktivitu proti leishmaniím, dále na preventivní vlastnosti v případě nádorového onemocnění.

Zjišťovala se také cytotoxická aktivita proti šesti lidským nádorovým buněčným liniím, mezi nimiž byly buňky způsobující chronickou myeloidní leukémii, akutní B-lymfoblastickou leukémii, akutní promyelotickou leukémii, T-leukémii, karcinom plic nebo karcinom děložního čípku. Výsledky tohoto testu však bohužel ukázaly, že získané kumariny nebyly účinné proti žádné z nich. Pro vytvoření lepší představy o cytotoxickém potenciálu byly nejaktivnější složky dále zkoušeny in vitro na lymfocytech pocházejících z periferní krve zdravých dárců.^[16]

Jiná studie, zaměřená pouze na druh *Ferulago campestris*, se zabývala izolací a charakterizací kumarinů obsažených v kořenech této rostliny. Pomocí chromatografických metod a 1D a 2D NMR spektroskopie byla objasněna struktura *ostholu*. Následně byly izolovány estery pyranokumarinu *aegelinolu*, identifikované jako *grandivittin*, *agasyllin* a *aegelinol benzoát*. Zkoumání dichlormethanového extraktu připraveného pro chromatografii vedlo k získání *felamidinu*, kumarinu s přikondenzovaným furanovým kruhem.

Grandivittin, *agasyllin*, *aegelinol* a *aegelinol benzoát* prošly poté testováním jejich antibakteriální aktivity proti devíti grampozitivním i gramnegativním bakteriálním kmenům. Použity byly jednak takzvané ATCC mikroorganismy, jež jsou poskytovány privátní organizací zabývající se standardními referenčními kmeny, jednak bakterie klinicky izolované. Mezi čtyřmi zkoušenými kumariny, pouze *aegelinol* a *agasyllin* projevily významný antibakteriální efekt proti testovaným kmenům, zejména proti gramnegativním. Největší inhibiční účinek s MIC hodnotami 16 µg/ml pro *aegelinol* a 32 µg/ml pro *agasyllin* byl zaznamenán u kmenů *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* či *Salmonella typhi*, která způsobuje závažné infekce a vůči běžně podávaným antibiotikům bývá velmi často rezistentní.

Aktivita obou kumarinů byla prokázána také u gramnegativní bakterie *Helicobacter pylori* sídlící v mukózní vrstvě lidského žaludku. Infekce vyvolané tímto patogenem vedou k tvorbě peptických vředů, gastritidám a mohou být příčinou vzniku adenokarcinomu. Dávkově závislá inhibice se projevila mezi 5 a 25 µg/ml.

Vzhledem k tomu, že kumariny působí jako lapače volných radikálů, zkoušel se rovněž jejich antioxidační účinek. U *aegelinolu*, *agasyllinu* a *grandivittinu* byla tato schopnost posouzena na lidských krevních leukocytech a izolovaných polymorfonukleárech v koncentračním rozmezí 0,01 – 100 µg/ml chemiluminiscencí. Nejaktivnějším se zdál *aegelinol*, následovaný *agasyllinem* a nejméně aktivním *grandivitinem*. Data získaná v této studii mohou poskytnout odpovědi na neustálou poptávku po nových antibioticích a antioxidantech pro rezistentní kmeny a zvyšující se zájem o náhradu syntetických antioxidantů těmi přírodními.

Pro své sedativní, tonické, podporující trávení a afrodisiakální vlastnosti jsou někteří zástupci rodu *Ferulago* již od dávných dob používáni v lidovém léčitelství. Kromě toho se dají využít v léčbě vředových onemocnění, onemocnění sleziny, při bolestech hlavy a dokonce hadím kousnutí. Šťáva získaná po naříznutí kořene slouží jako koření a prostředek proti červům parazitujícím ve střevech.^[17]

Zajímavými, i když negativními účinky se vyznačuje také druh *Ferula communis*. Jeho antikoagulační prenylované 4-hydroxykumariny zodpovídají za otravy ovcí pasoucích se v oblasti kolem Středozemního moře. Pozorovány byly krvácivé průjmy, hematurie i vnitřní krvácení.^[2]

3.6 Kumariny v rostlinách čeledi Asteraceae

Čeleď Asteraceae představuje jednu z druhově nejbohatších čeledí cévnatých rostlin. Okolo 20 000 druhů jednoletých, dvouletých i vytrvalých bylin, polokeřů a mimo území ČR také keřů a stromů můžeme zařadit do zhruba 1 200 rodů.^[7]

3.6.1 *Hieracium pilosella*

Název: *Hieracium pilosella* (jestřábník chlupáček)

Čeleď: Asteraceae (hvězdnicovité)

Hieracium pilosella je malá vytrvalá bylina rostoucí na sušších porostech Evropy a severní Asie. Francouzský lékopis uvádí jako officinální celou rostlinu. Mezi významné sekundární metabolity patří mimo jiné glykosidicky vázaný *umbeliferon*. Podle některých starších studií je tento jednoduchý kumarin zodpovědný za bakteriostatické účinky drogy, jež byly využívány v léčbě brucelózy ve veterinární medicíně. Bez jakýchkoliv farmakologických nebo klinických dat je droga tradičně využívána také k posílení vylučovacích funkcí močových cest a zažívacího traktu, stejně jako podpoře renální exkrece.^[2]



Obr. 11: *Hieracium pilosella* ^[37]

3.6.2 *Artemisia capillaris*

Název: *Artemisia capillaris*

Čeleď: Asteraceae (hvězdnicovité)

Z hlediska obsahových látek a jejich účinku stojí za zmínku také *Artemisia capillaris*, vytrvalý keřík rozšířený v oblastech východní Asie.^[18]

Tento druh pelyňku byl spolu s dalšími druhy studován a následně vyhodnocen jako nejúčinnější z hlediska inhibice tvorby produktů pokročilé glykace (=AGEs), heterogenní skupiny látek hrajících roli v patogenezi chronických onemocnění a jejich komplikací. Příkladem takového onemocnění může být diabetes mellitus, kde tvorba glykovaných produktů způsobuje mikrovaskulární komplikace, jako jsou nefropatie vedoucí k selhávání ledvin, zvýšení propustnosti krevních kapilár, neuropatie či neméně závažné retinopatie. Mimo diabetes mohou AGEs iniciovat také Alzheimerovu chorobu, aterosklerózu nebo revmatoidní artritidu.

Pro lepší představu o účinku *Artemisia capillaris* byla provedena kolonová chromatografie, která vedla k izolaci několika látek. V případě kumarinů se jednalo o *umbeliferon*, *eskuletin*, *skopoletin*, *skopolin*, *isoskopolin* a *skoparon*. Studium vztahu mezi jejich strukturou a výše zmíněným účinkem se zjistilo, že v inhibici tvorby AGEs může hrát klíčovou roli přítomnost a také poloha hydroxylové skupiny. Volná hydroxylová skupina v poloze 7 a glukosylová namísto methoxylové skupiny v poloze 6 jsou dva důležité parametry pro inhibiční potenciál těchto kumarinů. Na tomto základě je lze považovat za možné kandidáty pro terapeutické nebo preventivní použití v případě komplikací diabetu a nemocí spojených s oxidačním stresem.^[19,20]

3.7 Kumariny v rostlinách čeledi Fabaceae

Další čeledí zahrnující dřeviny i byliny s obsahem kumarinů je čeleď Fabaceae. Celkově je tvořena asi 480 – 500 rody a až 12 000 druhů rostoucích téměř po celém světě. Řadí se tak mezi nejpočetnější čeledi vůbec.^[7]

3.7.1 *Dipteryx odorata*

Název: *Dipteryx odorata* (silovoň vonná)

Čeleď: Fabaceae (bobovité)

První rostlinou, kterou nelze opomenout, je již v úvodu zmíněná silovoň vonná, dřevina z oblastí Jižní Ameriky. Využívána je především pro semena, která obsahují 1 – 3 % *kumarinu*, látky uvedené v kapitole Zkoumadla Českého lékopisu 2009.^[11] Kromě izolace této sloučeniny se semena v Brazílii používají také k aromatizaci tabáku.

Kumarin jako takový však není typický pouze pro silovoň vonnou. V hojném množství jej lze nalézt také v mnoha druzích čeledi Poaceae, např. v jarní trávě tomce vonné (*Anthoxanthum odoratum*, Poaceae). Do roku 1996 byl k sehnání na francouzském trhu. Indikován byl k léčbě lymfedému paže, následně pak k radioterapii nebo chirurgickému odstranění rakoviny prsu v dávce 90 – 135 mg/den. Vzhledem k velkému počtu případů hepatitidy přisuzovanému právě *kumarinu* (2 – 4 z 10 000 pacientů) byla všechna léčiva s jeho obsahem ve Francii z trhu stažena. S přihlédnutím k evropským směrnici nakonec místní vláda stanovila maximální množství *kumarinu* v jídle a nápojích, které nesmí přesahovat 2 mg/kg, výjimečně 10 mg/kg.

Stejná situace, včetně jednoho úmrtí, byla hlášena také ve Švýcarsku a Austrálii, vždy však ve spojitosti s vysokými dávkami. V nízkých dávkách se tak *kumarin* dále vyskytuje v přípravcích obsahujících mařinku vonnou (*Galium odoratum*, Rubiaceae).^[2]



Obr. 12: *Dipteryx odorata* ^[38]

3.7.2 *Melilotus officinalis*

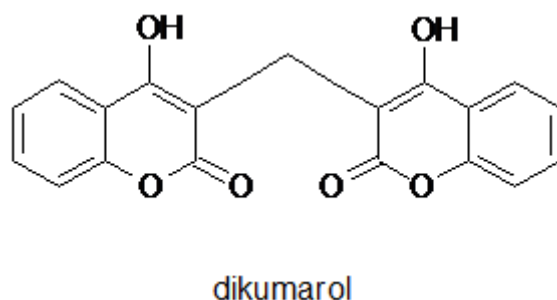
Název: *Melilotus officinalis* (komonice lékařská)

Čeleď: Fabaceae (bobovité)

Melilotus officinalis je dvouletá bylina v Česku známá jako komonice lékařská. Běžně ji nalezneme podél krajů silnic nebo na polích, která nejsou příliš opečovávaná, a to prakticky v celé Evropě. Podle Francouzského lékopisu 2010, stejně jako Českého lékopisu 2009, je oficiální drogou komonicová nat'.^[2]

Uplatnění má bylina široké. Ověřeny jsou její schopnosti posilovat cévy a ředit krev, čehož se využívá při léčbě trombózy křečových žil a poruch oběhu krve. Účinek se přenáší až do krevních kapilár, takže působí také v lymfatických cestách. Kromě toho čaj z komonice příznivě ovlivňuje játra, odstraňuje bolesti hlavy a zvyšuje tvorbu mateřského mléka.^[21]

Rostlina je zajímavá také pro svůj obsah sekundárních metabolitů. Z hlediska kumarinů je důležitý melilotosid nacházející se zejména v mladých listech. Jedná se o glykosid *o*-hydroxyskořicové kyseliny, který po hydrolýze podléhá laktonizaci na *kumarin*. V případě kontaminace mikroorganismy však může být *o*-hydroxyskořicová kyselina jejich činností přeměněna na *4-hydroxykumarin*. Ten po reakci s formaldehydem, běžně přítomným díky degradačním reakcím mikroorganismů, poskytuje kombinační produkt dikumarol. Tato sloučenina má výrazné antikoagulační vlastnosti zodpovědné za otravy a úhyn dobytka v důsledku vnitřního krváčení. Patří mezi předchůdce warfarinu, antikoagulant používaného v medicíně dodnes.^[22]



Obr. 13: Struktura dikumarolu

Kumarin takovéto účinky nemá. Sám stimuluje retikuloendoteliální systém a podporuje aktivitu makrofágů. V kombinaci s rutinem, flavonoidním glykosidem, je na základě placebem kontrolovaných klinických studií indikován pro léčbu příznaků nedostatečnosti žilního a lymfatického systému (např. plnost nohou, bolest, syndrom neklidných nohou, noční křeče, otoky) či léčbě symptomů akutního hemoroidálního záchvatu.

Rostlinné přípravky z komonice jsou tradičně užívány perorálně nebo topicky pro potlačení projevů lomivosti kožních kapilár, na pohmožděnin, krevní výrony nebo povrchová krváčení, kde byla aktivita ověřena v testech na zvířatech. Účinné však mohou být i v případě gastrointestinálních potíží jako je nadýmání, poruchy trávení, říhání a plynatost. U dětí i dospělých

pomáhají při mírné nespavosti. Lokální aplikace je pak možná při podráždění oka nebo pocitu dyskomfortu způsobeném namáháním oka či pobytem v zakouřeném prostředí.^[2]



Obr. 14: *Melilotus officinalis* (upraveno) ^[39]

3.7.2 *Glycyrrhiza glabra*

Název: *Glycyrrhiza glabra* (lékořice lysá)

Čeleď: Fabaceae (bobovité)

Významným zástupcem čeledi Fabaceae je vytrvalá bylina *Glycyrrhiza glabra* pocházející z oblasti Středomoří.^[1,10]

Oficinální drogou je podle Českého lékopisu 2009 lékořicový kořen, jež se vyznačuje širokou škálou účinků. Pozorovány byly jeho antacidní, antiulcerózní, protizánětlivé,

expektorační, diuretické, antipyretické, antimikrobiální, anxiolytické i antikonvulzivní vlastnosti. Příznivě působí také na zlepšení paměti. Vodný extrakt kořene byl navíc testován na myších pro posouzení jeho antidepressivního účinku. Výsledky naznačily, že tento extrakt může mít terapeutický potenciál v rámci depresivních poruch.

Mezi obsahovými látkami můžeme nalézt v menší míře také jednoduché kumariny jako je *liqcoumarin* nebo hydroxykumariny *umbeliferon*, *herniarin*, *glycycoumarin* a *licopyranocoumarin*.^[23,24]

3.8 Kumariny v rostlinách čeledi Rutaceae

Čeleď Rutaceae sice nepatří mezi druhově nejbohatší, přesto i zde je možné nalézt zástupce s obsahem kumarinů. Celkově je tvořena asi 150 rody, mezi něž je rozděleno okolo 900 druhů. Rozšířené jsou hlavně v tropických a subtropických oblastech.^[7]

3.8.1 *Aegle marmelos*

Název: *Aegle marmelos* (oslizák líbezný)

Čeleď: Rutaceae (routovité)

Jednou z nejdůležitějších léčivých rostlin v oblasti Indie, Barmy a Srí Lanky je středně vysoký, štíhlý, aromatický strom *Aegle marmelos*.

Pro své antidiabetické, antioxidační, antiulcerózní, protizánětlivé, protinádorové, radioprotektivní, antihyperlipidemické, antimykotické, antibakteriální i antivirové účinky se často využívá v etnomedicíně. Nejinak je tomu i v medicíně tradiční, kde se odvarem z kořenů léčí melancholie či intermitentní horečka (stav, kdy se během dne střídá vysoká teplota s teplotou normální až subnormální), zralými plody chronický průjem a úplavice, čerstvými listy pak stavu

srdeční slabosti, edémy nebo nemoc beri-beri (onemocnění vzniklé nedostatkem vitamínu B₁). Dalšími indikacemi pak mohou být onemocnění očí, střev nebo dokonce otravy rybami.

Rozsáhlé zkoumání různých částí dřeviny vedlo k izolaci velkého spektra látek, mezi nimiž byly identifikovány také kumariny *marmelosin*, *marmesin*, *imperatorin*, *marmin*, *alloimperatorin*, *xanthotoxol*, *skopoletin*, *skoparon*, *umbeliferon*, *psoralen*, *marmelid*, *marmenol* a *aurapten*.

Jejich přítomnost v plodech má pravděpodobně za následek antidiabetické působení extraktu z těchto plodů připraveného. U potkanů trpících diabetem došlo k výraznému snížení hladiny glykovaného hemoglobinu a glukózy v krvi a naopak zvýšení hladiny jaterního glykogenu a plasmatického inzulínu podpořením jeho sekrece z β buněk pankreatu. Hypoglykemický efekt po perorálním i intraperitoneálním podání vodného extraktu z plodů nastal i u krys s diabetem indukovaným antibiotikem streptozocinem. V koncentraci 250 mg/kg se tento extrakt zdá dokonce účinnější než dobře známé antidiabetikum glibenklamid.

Podobný účinek byl zaznamenán u extraktu z listů. Při jeho podávání po dobu 15 dní v rámci nekontrolovaných klinických studií došlo k redukci hladiny krevního cholesterolu a mírnému snížení hladiny glukózy v krvi u některých pacientů s diabetem.

In vitro studie prováděné na různých částech oslízáku ukázaly, že má tato rostlina nemalý potenciál působit proti virům. Srovnáním IC₅₀ hodnot (koncentrace složky potřebná pro 50% inhibici růstu) listů, stonku a stonkové kůry, kořenu a kořenové kůry a samotného *marmelidu* z pokusů na lidském Cocksackie viru se zjistilo, že nejúčinnější je právě posledně zmiňovaný kumarin. Jeho IC₅₀ byla 62,5 μ g/ml, kdežto hodnoty ostatních testovaných částí se pohybovaly v rozmezí 250-1000 μ g/ml. Standardně používané chemoterapeutikum ribavirin má tuto hodnotu ještě vyšší. Výhodou *marmelidu* je navíc také to, že ovlivňuje replikaci viru v její rané fázi a na organismus hostitele nepůsobí nežádoucími účinky. Moderní ribavirin naopak účinkuje až v pozdní fázi replikace a jeho cytotoxicita je velmi značná. Výrazný virucidní potenciál rostliny tak může přispět k jejímu využití jako antivirového prostředku v nejbližší budoucnosti.

Jednou z dalších možných oblastí uplatnění oslízáku jsou onemocnění srdce. Prozkoumán byl efekt methanolového extraktu z kořenové kůry a stejně tak izolovaných složek na spontánní tlukot kultivovaných myších myokardiálních buněk. Samotný extrakt v koncentraci 100 μ g/ml

snižoval rychlost bití přibližně o 50 %. Z izolovaných složek byl nejlépe vyhodnocen *aurapten*, který takto působil v koncentraci 0,6 µg/ml, což je hodnota srovnatelná s běžně používaným antagonistou vápníkových kanálů verapamilem. Přidáním *auraptenu* v koncentraci vyšší než 1 µg/ml navíc výrazně snižuje poměr morfologicky změněných buněk myokardu. Tyto změny nastávají při přetížení vápníkem způsobeném postupným podáváním roztoků s jeho obsahem a roztoků jej neobsahujících.^[25]

Nadějnou alternativou drahých léčiv může být tato indická rostlina také pro pacienty se syndromem získané imunodeficiency. Pro testování anti-HIV aktivity byly vybírány druhy se složkami chemicky podobnými známým anti-HIV složkám nebo druhy používané tradičně jako imunomodulátory. Připravený methanolový extrakt z plodů byl testován na lidské CD4+ T buněčné linii CEM-GFP buněk infikovaných HIV-1NL4. Tyto buňky se po dobu 7 dnů nechaly se vzorkem inkubovat a následně pomocí antigenového zachytu ELISA byla v kultivačním supernatantu produkce viru analyzována. Methanolový extrakt z plodů obsahuje především kumariny a furanokumariny. Nejvýraznější inhibici okolo 60% ukázal *imperatorin* v koncentraci 8 µg/ml. Podobný furanokumarin *xanthotoxol* a *xanthotoxin* postrádající prenylovou skupinu byly aktivní jen slabě. Jejich koncentrace se pohybovala okolo 20 µg/ml. *Umbeliferon* ve stejné koncentraci žádnou aktivitu neprojevil a *aurapten* s geranylovou skupinou byl proti HIV účinný pouze mírně. Z hlediska struktury se tedy jako optimální pro anti-HIV působení těchto složek jeví přítomnost prenylové skupiny a furanokumarinová kostra.^[26]

Ačkoli je spektrum využití široké, většina složek stále nebyla hodnocena ve výzkumu nových vedoucích složek nebo farmakoforů. Pro objasnění jejich bioaktivity i mechanismu účinku, stejně jako účinnosti léčivých přípravků z rostliny, jsou potřeba rozsáhlé výzkumy. Extrakty z různých částí oslízáku budou tedy nadále využívány jako zdroje užitečných složek a hrát velmi důležitou roli v moderní medicíně.^[25]



Obr. 15: *Aegle marmelos* ^[40]

3.8.2 *Clausena excavata*

Název: *Clausena excavata*

Čeleď: Rutaceae (routovité)

Bohatý zdroj léčivých přírodních produktů představuje také *Clausena excavata*, divoce rostoucí keř v tropických a subtropických oblastí Asie. Původní oblastí je především území Himalájí a Číny.

Ve formě prášku nebo kapaliny je jedna nebo směs dvou a více částí rostliny v současnosti intenzivně využívána v tradiční medicíně pro léčbu abdominálních bolestí, hadího uštknutí nebo jako detoxikační činidlo. Drcený kořen slouží k obkladům na vředy, zatímco jeho odvar působí při

střevních potíží, zejména kolikách. Ženám je po narození dítěte podáván odvar z listů. Ty se také dají použít při nachlazení, malárii nebo úplavici.

Z různých částí rostliny bylo možné izolovat a za pomoci spektroskopických metod charakterizovat mnoho sekundárních metabolitů včetně kumarinů. V případě listů došlo k objevu nových kumarinů pojmenovaných *excavacoumarin A* a *B*, kumarinů s terpenickým postranním řetězcem zvaných *clauslacton R, S* a *T* a furanokumarinů *clauslactonu N, O, P* a *Q*. Z listů rostlin pěstovaných ve sklenících bylo navíc získáno a charakterizováno deset nových furanokumarinů pojmenovaných *clauslacton A, B, C, D, E, F, G, H, I* a *J*, spolu se známým kumarinem *umbeliferonem*. Chemické zkoumání plodů a stonku vedlo k izolaci a identifikaci kumarinu *clausenaexcavinu*. Z nadzemních částí rostliny byl získán nový dimerický kumarin *diseselin B* a O-terpenoidní kumariny označené jako *excavacoumarin B, C, D, E, F* a *G*. Z oddenků a kořenů se izoloval *clausenidin*. V případě zmíněných *clauslactonů A, B, C* a *D* je jejich terpenický postranní řetězec spojen se základním kumarinovým jádrem 1,4-dioxanovým cyklickým systémem, což je první případ kumarinu s touto strukturální charakteristikou vyskytujícího se v přírodě.

Většina izolovaných složek rostliny se prezentuje rozličnými biologickými vlastnostmi. V terapii se mohou uplatnit např. účinky protinádorové, insekticidní, imunomodulační, protidestičkové, antimykobakteriální či účinky proti plasmodiím a viru HIV.

Cytotoxická aktivita vůči čtyřem lidským nádorovým buněčným liniím (A549, MCF7, KB a KB-VIN) byla objevena u pyranokumarinů *nordentatinu*, *xanthoxyletinu* a *clausarinu* izolovaných z *Clausena excavata* pocházející z oblasti Malajsie. První dva jmenované spolu s *dentatinem* a *clausenidinem* navíc působí proti mykobakteriím. Nejmenší hodnotu MIC 50 µg/ml zaznamenal *dentatin* následovaný *nordentatinem* a *xanthoxyletinem* s MIC 100 µg/ml. Nejvyšší hodnota 200 µg/ml patřila *clausenidinu*.

Určitý potenciál vykazují *dentatin* a *nordentatin* také v případě syndromu získané imunodeficiency. Toxicita vůči HIV viru byla hodnocena v testu s buněčným syncytiem.

Ačkoliv byly provedeny početné studie různých částí rostliny, do dnešního dne nebyla rostlina vyvíjena a propagována jako vhodné léčivo farmaceutického průmyslu.^[27]

3.8.3 *Zanthoxylum schinifolium*

Název: *Zanthoxylum schinifolium* (žlutodřev vínobobovitý)

Čeleď: Rutaceae (routovité)

Žlutodřev vínobobovitý je dvoudomý aromatický keř čeledi Rutaceae, jehož domovem jsou oblasti Asie, zejména pak Čína, Japonsko a Korea.

Široce využívaným je v asijském kulinářství a tradiční orientální medicíně, kde se osvědčil jako prostředek proti nachlazení, bolestem břicha, průjmů a žloutence. V Číně jej obvykle podávají pro podporu krevní cirkulace a proti bolestem různého původu.

V současné době se mnoho fytochemických výzkumů rostliny zaměřuje, mimo jiné, na látky typu kumarinů nacházejících se v listech a plodech. Pomocí 1D a 2D NMR spektroskopie byla objasněna struktura jedenácti kumarinů – *hymexelsinu*, *skopolinu*, *skopoletinu*, *phytodoloru*, *daphnetinu*, *skoparonu*, *lacinartinu*, *puberulinu*, *collininu*, *8-methoxyanisocoumarinu H* a *acetoxyschinifolinu*. K těmto již dříve známým látkám se přidala jedna nově objevená, glykosidicky vázaný kumarin *zanthoxylosid*.

V příslušných testech bylo možné dokázat, že k významným vlastnostem izolovaných složek patří protinádorová aktivita. Zkoušení inhibice růstu proběhlo na buňkách HL-60 (lidská akutní promyelotická leukémie), PC-3 (lidská rakovina prostaty) a SNU-C5 (kolorektální karcinom) pomocí testu s 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidem (MTT test). Životaschopnost nádorových buněčných linií byla následně vyhodnocena změřením absorbance při 540 nm pomocí spektrofotometru. Hodnoty IC₅₀ jednotlivých kumarinů shrnuje tabulka na obr. 16 na následující straně. Podle této lze říct, že největší potenciál inhibovat růst HL-60 buněk má molekula *collininu*. Nejsilnější efekt ze všech prokázala i v případě zbývajících dvou nádorových buněčných linií. Ve svém účinku překonala i cytostatikum mitoxantron, použitý v testu jako pozitivní kontrola.

Zkoumáním vztahu mezi účinkem a strukturou bylo zjištěno, že struktura nejlépe hodnoceného *collininu*, *8-methoxyanisocoumarinu H* a *acetoxyschinifolinu* má určité odlišnosti

v přítomnosti funkčních skupin na skeletu zvyšující jejich cytotoxickou aktivitu. Jedná se především o postranní řetězec v pozici 7 kumarinového jádra spojený s *trans*-geraniolovým derivátem, který zvýšený účinek zapříčiňuje. Naproti tomu látky s prenyloxy- skupinou v této poloze, jako je *lacinartin* či *puberulin*, mají cytotoxické vlastnosti jen mírnější. Z uvedeného vyplývá, že důležitou roli hraje délka postranního řetězce. Další substituenty, např. cukry, hydroxy- nebo methoxy- skupina, většinou inhibici růstu nádorových buněk nepodporují.

V rámci protinádorového výzkumu se hodnotil také vliv izolovaných složek na indukci apoptózy. Apoptóza je komplexní fyziologický proces, který umožňuje redukci škodlivých nebo nepotřebných buněk během vývoje tkáně nebo vzniklého onemocnění. K posouzení, zda izolované složky mohou tento děj vyvolat, byla provedena analýza buněčného cyklu barvením DNA propidium jodidem a následně průtokovou cytometrií. Hodnocený *collinin*, *8-methoxyanisokoumarin* i *acetoxyschinifolin* schopnost indukce apoptózy prokázaly. Ze studií prováděných na žlutodřevu tak vyplývá, že izolované kumariny inhibují růst tří nádorových buněčných linií právě indukcí apoptózy mechanismem modulace příslušných proteinů, tzv. apoptosis-related proteins. Tyto výsledky naznačují, že kumariny pocházející ze stonků žlutodřevu by mohly být využívány v léčbě nádorových onemocnění. Pro potvrzení je však nutné prozkoumat vliv látek na prevenci rakoviny a regresi nádoru také *in vivo*.^[28]

		IC ₅₀ nádorových buněčných linií (μM)		
	složka	HL-60	PC-3	SNU-C5
1	zanthoxylosid	>100	>100	>100
2	hymexelsin	>100	>100	>100
3	skopolin	>100	>100	>100
4	skopoletin	>100	>100	>100
5	phytodolor	19,80	>100	>100
6	daphnetin	77,66	>100	>100
7	skoparon	74,29	>100	>100
8	lacinartin	28,18	71,01	92,93
9	puberulin	21,77	30,11	67,64
10	collinin	4,62	4,39	6,26
11	8-methoxyanisocoumarin H	5,02	12,22	33,50
12	acetoxyschinifolin	5,12	33,81	35,11

Obr. 16: Hodnoty IC₅₀ izolovaných kumarinů

3.9 Kumariny v rostlinách čeledí Moraceae, Hippocastanaceae, Rubiaceae a Thymelaeaceae

Obdobně jako některé již dříve zmíněné čeledi nepatří ani čeledi Moraceae, Hippocastanaceae a Thymelaeaceae k druhově rozsáhlým. Výjimkou je v tomto ohledu čeleď Rubiaceae. Jednotliví zástupci rostou převážně v tropických a subtropických oblastech. Druhy čeledi Hippocastanaceae je možné nalézt také v pásu mírném.^[7] Důležitými obsahovými látkami jsou mimo jiné také kumariny.

3.9.1 *Ficus carica*

Název: *Ficus carica* (Fíkovník smokvoň)

Čeleď: Moraceae (morušovníkovité)

Ficus carica je středně velká, ovocná dřevina z čeledi Moraceae. Pochází z jihovýchodní Asie, odkud byla postupně zavlečena do Středomoří a jižních oblastí středního pásma, kde je dosud uměle vysazována.^[1,10]

Fíkové plodenství, fíky, jsou využívány především pro potravinářské účely a působí mírným projímavým účinkem. Latex, uvolněný při jejich sklizni, slouží k léčbě kožních nádorů a bradavic. Ve vysokých dávkách podávaných injekčně testovaným krysám působil smrtelně. Menší dávky, aplikované rovněž injekčně, naopak inhibují růst nádoru u krys s benzopyreny navozeným sarkomem.

Zajímavé účinky má také odvar z listů. U krys trpících hypertriglyceridemií ovlivňuje katabolismus lipidů a u pacientů s diabetem prvního typu snižuje hladinu glykémie.

Extrakcí listů bylo navíc získáno několik chemických sloučenin, včetně kumarinů *psoralenu* a *bergaptenu*. Ty byly nalezeny také v kůře a dřevnatých částech stromu. Plynovou

chromatografií se stanovil jejich obsah v jednotlivých částech. Z výsledků poté vyplynulo, že se jedná o hlavní složky všech částí. Největší podíl byl nalezen v listech.

Kůra, dřevo i listy byly následně testovány s cílem posoudit jejich antioxidační aktivitu, schopnost vychytávat volné radikály a fototoxické působení na nádorové buňky C32 (kožní melanom). Zároveň byl zkoumán vztah těchto účinků k izolovaným látkám.

Při testování fototoxicity byla nádorová linie C32 po příslušné úpravě a ozáření po dobu 48 hodin inkubována spolu se vzorkem. Po skončení inkubace se životaschopnost buněk hodnotila MTT testem. Podle hodnot IC_{50} bylo možné říci, že nejlépe si vedly listy, následované kůrou a nakonec dřevem. Důvod spočívá ve výskytu konkrétních obsahových látek a jejich koncentraci. Antiproliferativní účinek může být tedy přisuzován i přítomným furanokumarinům. Ty pak mohou představovat nové potencionální přírodní léčivé látky pro léčbu několika typů nádorů a kožních potíží. V případě fíkovníku je ale nutné provést další experimenty, které by objasnily biologickou dostupnost látek i možné toxické účinky *in vivo*. Provedená fototoxická studie však potvrdila, že látky přírodního původu jsou důležitým zdrojem pro vývoj nových protinádorových léčiv.^[29]



Obr. 17: *Ficus carica* ^[41]

3.9.2 *Aesculus hippocastanum*

Název: *Aesculus hippocastanum* (jírovec maďal)

Čeleď: Hippocastanaceae (jírovcovité)

Statný, listnatý strom čeledi Hippocastanaceae, jírovec maďal, je nejen okrasná dřevina parků a zahrad, ale také významný zdroj surovin pro farmaceutické účely. Původní oblastí výskytu je jihovýchodní Evropa, ale nalézt jej dnes můžeme prakticky v celém mírném pásu Evropy.^[1,10]

Extrakt z kůry a semen můžeme využít při léčbě chronické žilní nedostatečnosti, křečových žil, hemoroidů, pooperačních edémů, popálenin, kožních zánětů a omrzlin. Terapie by měla probíhat krátkodobě a nejlépe lokálně, aby se předešlo nevolnostem, zvracení či žaludečním křečím, které by se při perorálním podání mohly vyskytnout.^[21,30,31]

Chemické zkoumání květů jírovce vedlo k izolaci jednoduchým kumarinů *eskulinu*, *eskuletinu*, *skopoletinu* a *fraxetinu*. Identifikovány byly pomocí UV, NMR a hmotnostní spektrometrie. Pomocí UPLC chromatografie se poté stanovil jejich obsah.

Všechny izolované kumariny prokázaly biologickou aktivitu. *Eskuletin* a *eskulin* (glykosid *eskuletinu*) inhibují srážení krve, zvyšují žilní tonus a stimulují žilní návrat. *Skopoletin* působí spasmolyticky, snižuje krevní tlak a spolu s *eskuletinem* a *fraxetinem* brání vzniku lipoxygenázy a cyklooxygenázy a působí tak protizánětlivě.^[30]

Eskulin, *eskuletin* a jeho methylovaný derivát *4-methyleskuletin* jsou součástí patentových léčiv, které jsou v závislosti na složení (např. kombinace s flavonoidy, extraktem z *Ruscus*, lokálními anestetiky, tokoferolem nebo askorbovou kyselinou) propagovány pro léčbu příznaků žilní a lymfatické nedostatečnosti, funkčních příznaků akutního záchvatu hemoroidů nebo obojího.^[2]

Kumarin *eskulin* je také součástí Českého lékopisu. Uveden je v rámci kapitoly Zkoumadla.^[11]

3.9.3 *Galium odoratum*

Název: *Galium odoratum* (svízel vonný, mařinka vonná)

Čeleď: Rubiaceae (mořenovité)

Z hlediska přítomnosti kumarinů a jejich vlastností je zajímavou bylinou také *Galium odoratum*. Jedná se o vytrvalou rostlinu rozšířenou převážně v Evropě, ale také v Severní Americe, Africe i západnějších částech Asie.^[1,10]

Nadzemní části jsou tradičně užívány v léčbě neurotických příznaků, jakými mohou být např. poruchy spánku. Podobně jako rostliny rodu *Angelica* nachází uplatnění i v léčbě gastrointestinálních potíží.

Sušená droga, podle Francouzského lékopisu officinální, obsahuje kromě jiných sekundárních metabolitů také *kumarin*. Identifikován byl na základě tenkovrstvé chromatografie methanolického extraktu drogy. Metoda je uvedena i ve zmíněném lékopise.^[2]

3.9.4 *Daphne cneorum*

Název: *Daphne cneorum* (lýkovec vonný)

Čeleď: Thymelaeaceae (vrabečnicovité)

Daphne cneorum je nízký stálezelený keřík. Roste prakticky v celé Evropě, včetně České republiky, kde však patří mezi kriticky ohrožené druhy.^[10]

Zástupci rodu *Daphne* mají v přírodní medicíně bohaté využití zahrnující např. léčbu malárie, bolesti zubů či kožních onemocnění. Pozorován byl také jejich diuretický, laxativní a antikoagulační účinek. Prováděné studie jednotlivých druhů následně podpořily jejich potenciál medicínského využití.

Mezi obsahovými látkami lýkovce dominují, spolu s flavonoidy a lignany, kumariny. Na základě vysokoúčinné kapalinové chromatografie prováděné na methanolovém extraktu z větviček a listů byl jako nejhojněji zastoupený sekundární metabolit vyhodnocen *daphnetin*.

Oba extrakty byly poté podrobeny *in vitro* zkoušce na antimikrobiální aktivitu. Testovány byly ATTC bakterie *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* a ATTC houby *Candida albicans* a *Aspergillus niger*. MIC hodnoty extraktu z listů pro jednotlivé mikroorganismy se pohybovaly v rozmezí 15,62 – 62,50 µg/ml, přičemž nejmenší koncentrace byla zaznamenána u bakterie *Proteus vulgaris*. V případě bakterií *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* a houby *Aspergillus niger* byla naopak potřebná koncentrace nejvyšší. Podobné výsledky byly získány také u extraktu z větviček. Příčina této značné antimikrobiální aktivity obou extraktů je pravděpodobně dána přítomností kumarinů.^[32]



Obr. 18: *Daphne cneorum* ^[42]

3.10 Kumariny produkované mikroorganismy

Ačkoli byla většina přirozeně se vyskytujících kumarinů izolována převážně z vyšších rostlin, bylo zjištěno, že tyto látky mohou být produkovány také mikroorganismy.

Zdrojem několika důležitých kumarinů, jako je *novobiocin*, *clorobiocin* či *coumermycin A* jsou grampozitivní anaerobní bakterie rodu *Streptomyces* nebo vřeckovýtrusné houby rodu *Aspergillus*, jež produkují vysoce toxické aflatoxiny v čele s aflatoxinem B₁.

Kumariny *novobiocin*, *clorobiocin* a *coumermycin A* izolované z různých druhů rodu *Streptomyces* patří mezi skupinu antibiotik inhibujících DNA gyrázu. Jejich společným znakem je 3-amino-4-hydroxykumarinové jádro a substituovaný deoxycukr noviosa, strukturní prvky nezbytné pro zachování biologické aktivity.^[33]

4. DISKUZE A ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo shrnout současný stav poznání o kumarinech, tedy látkách patřících mezi sekundární metabolity rostlin.

Jak již bylo zmíněno v úvodu, kumariny jsou typické pro mnoho druhů rostlin rostoucích téměř po celém světě. Hojně zastoupené jsou např. v čeledi Apiaceae, Rutaceae nebo Fabaceae. V rámci práce jsem tedy vybírala zástupce především z těchto čeledí, jelikož problematika kumarinů je zde dobře popsána. Volila jsem rostliny známější i ty méně známé. U každého druhu jsem se snažila poskytnout přehled o účincích rostliny, obsažených kumarinech, jejich identifikaci, vlastnostech a možném medicínském využití.

Značná část z popisovaných rostlin má široké uplatnění v tradiční lidové medicíně. Účinky, pro které se drogy užívají, jsou v mnoha případech dány právě přítomností kumarinů. Toto tvrzení bylo podpořeno i několika výzkumy biologické aktivity prováděnými na příslušných částech rostliny i jednotlivých kumarinech. Většina pokusů byla prováděna *in vitro*, ale v některých případech probíhalo testování také na zvířatech.

Mezi hlavní indikace obsahových látek a jejich zdrojů, které jsou v práci zmíněny, patří zejména onemocnění oběhového, trávicího a imunitního systému. Uplatnění tedy mohou nacházet v léčbě žilní a lymfatické nedostatečnosti, zvýšené lomivosti kapilár, hemoroidů (např. *Melilotus officinalis*), gastrointestinálních potíží (např. *Angelica archangelica*, *Torilis leptophylla*) nebo infekcí vyvolaných viry, bakteriemi i plísněmi (např. *Daphne genkwa*). Pozoruhodný je i jejich potenciál v případě tak závažných onemocnění jako jsou onemocnění nádorová (např. *Clausena excavata*) nebo syndrom získané imunodeficiency způsobený virem HIV (např. *Aegle marmelos*). Některé látky jsou díky fotosenzitivním vlastnostem použitelné také v terapii kožních potíží (např. *Ficus carica*). Pomoci mohou pacientům trpícím lupénkou nebo vitiligem. Jednou z uvedených rostlin byla také *Melilotus officinalis*. Ta je mimo jiné zajímavá tím, že při kontaminaci mikroorganismy poskytuje dikumarol (obr. 13), látku s výraznými antikoagulačními vlastnostmi. Dikumarol patří mezi předchůdce antikoagulačních látek, které se dodnes používají v medicíně.

I přesto, že se léčba přírodními látkami jeví mnohdy účinnější než běžně používaná syntetická léčiva, pro použití látek v praxi je potřeba provést ještě další studie, které by jednotlivé účinky blíže objasnily.

Kumariny mohou mimo rostlin produkovat také mikroorganismy. U několika zástupců bakterií a vřeckovýtrusných hub byly objeveny látky, které se vyznačují antibiotickými účinky. Jejich problematika byla alespoň částečně probrána v závěru této práce.

S ohledem na rozmanitost rostlinné říše a množství jejich produktů nejsou doposud veškeré informace o kumarinech, jejich účincích i zdrojích známé. Tato práce podává pouze představu, o jaké látky se jedná a jaké vlastnosti je u nich možno pozorovat. Zahrnuje jen malý zlomek kumarinů nacházejících se v přírodě.

5. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
UV	ultrafialové záření
UVA	ultrafialové záření typu A
MIC	minimální inhibiční koncentrace
TČM	tradiční čínská medicína
EMA	Evropská léková agentura
5-HT7	typ receptoru pro 5-hydroxytryptofan (serotonin)
NMR	nukleární magnetická rezonance
ATCC	kmen kultur amerického typu
ČR	Česká republika
AGEs	produkty pokročilé glykace
IC	inhibiční koncentrace
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
CD4 + T	nomenklaturní označení pro helperské T-lymfocyty
CEM-GFP	nádorová buněčná linie značená zeleným fluorescenčním proteinem
HIV-1NL4	typ viru lidské imunitní nedostatečnosti
ELISA	analýza s enzymem navázaným na imunosorbent
A549	buňky lidského adenokarcinomu plic
MCF7	buňky rakoviny prsu
KB	buňky nasofaryngeálního karcinomu
KB-VIN	multirezistentní buňky nasofaryngeálního karcinomu
MTT	test s 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie

6. REJSTŘÍK

A

<i>acetoxyschinifolin</i>	35, 36
<i>aegelinol</i>	22, 23
<i>aegelinol benzoát</i>	22
<i>agasyllin</i>	22, 23
<i>alloimperatorin</i>	31
<i>angelicin</i>	10, 16
<i>angelicon</i>	19
<i>angelol G</i>	19
<i>archangelicin</i>	16
<i>aurapten</i>	31, 32

B

<i>bergapten</i>	14, 16, 19, 37
------------------	----------------

C

<i>clausarin</i>	34
<i>clausenaexcavin</i>	34
<i>clausenidin</i>	34
<i>clauslacton A, B, C, D, E, F, G, H, I, J</i>	34
<i>clauslacton N, O, P, Q, R, S, T</i>	34
<i>clorobiocin</i>	42
<i>collinin</i>	35, 36
<i>columbianin</i>	12
<i>coumermycin A</i>	42

D

<i>daphnetin</i>	35, 36, 41
<i>demethylsuberosin</i>	13

<i>dentatin</i>	34
-----------------	----

<i>dihydrosamidin</i>	15
-----------------------	----

<i>diseselin B</i>	34
--------------------	----

E

<i>eskuletin</i>	9, 14, 25, 39
------------------	---------------

<i>eskulin</i>	9, 14, 39
----------------	-----------

<i>6-ethoxykumarin</i>	19
------------------------	----

<i>euphorbetin</i>	11
--------------------	----

<i>excavacoumarin A, B, C, D, E, F, G</i>	34
---	----

F

<i>felamidin</i>	22
------------------	----

<i>fraxetin</i>	39
-----------------	----

G

<i>glycycoumarin</i>	30
----------------------	----

<i>grandivitin</i>	22, 23
--------------------	--------

H

<i>heraclenin</i>	18
-------------------	----

<i>heraclenol</i>	18
-------------------	----

<i>herniarin</i>	30
------------------	----

<i>4-hydroxykumarin</i>	28
-------------------------	----

<i>hymexelsin</i>	35, 36
-------------------	--------

I

<i>imperatorin</i>	10, 18, 19, 20, 31, 32
--------------------	------------------------

<i>ismailin</i>	11
-----------------	----

<i>isoimperatorin</i>	18
-----------------------	----

<i>isoskopolin</i>	25
--------------------	----

J**K**

kumarin 8, 9, 13, 14, 26, 28, 40

L

lacinartin 35, 36

licopyranocoumarin 30

liqcoumarin 30

lomatin 12

M

marmelid 31

marmelosin 31

marmenol 31

marmesin 13, 31

marmin 31

8-methoxyanisokumarin H 35, 36

4-methyleskuletin 39

N

nordentatin 14, 34

novobiocin 42

O

osthol 16, 19, 22

oxypeucedanin 19

oxypeucedanin hydrát 18

P

phytodolor 35, 36

pimpinelin 10

psoralen 10, 13, 19, 31, 37

puberulin 35, 36

Q**R****S**

samidin 15

skoparon 25, 31, 35, 36

skopoletin 19, 25, 31, 35, 36, 39

skopolin 25, 35, 36

T**U**

umbeliferon 9, 12, 13, 19, 24, 25, 30, 31,
32, 34

V

visnadin 10, 15

W**X**

xanthotoxin 10, 15, 16, 32

xanthotoxol 31, 32

xanthoxyletin 34

xanthyletin 10

Y**Z**

zanthoxylosid 35, 36

7. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Barbora Staszková

Školitel: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Název diplomové práce: Rostliny jako zdroje kumarinů

Rostliny představují zdroj širokého spektra látek zvaných sekundární metabolity. K těmto látkám se řadí také kumariny, deriváty laktonu *o*-hydroxyskořicové kyseliny. Nacházejí se v mnoha druzích rostlin. Typické jsou především pro čeledi Apiaceae, Rutaceae nebo Fabaceae. Mohou být produkovány také mikroorganismy. Vyznačují se množstvím účinků využitelných v terapii cévních, gastrointestinálních nebo infekčních onemocnění. Vlastnosti, využití a zdroje některých z nich jsou předmětem této diplomové práce.

KLÍČOVÁ SLOVA: kumariny, sekundární metabolity, účinky

8. ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical botanic and ecology

Candidate: Barbora Staszková

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Plants as source of coumarins

Plants are source of a wide range of substances called secondary metabolites. These substances include also coumarins, derivatives of a lactone of *o*-hydroxycinnamic acid. They are found in many plant species and are specific especially for the family Apiaceae, Rutaceae or Fabaceae. They can be produced by some microorganisms. They have many effects in the treatment of vascular, gastrointestinal or infectious diseases. Properties, uses and sources some of these are the subject of this diploma thesis.

KEYWORDS: coumarins, secondary metabolites, effects

9. LITERATURA

1. JAHODÁŘ, L. *Farmakobotanika – semenné rostliny*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2. Str. 85, 116, 128, 129, 137, 231.
2. BRUNETON, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants*. 2nd Ed., 1999. Paris: Lavoisier Publishing Ing.; Hampshire, England: Intercept Ltd, c1995. ISBN 2-7430-0316-2. Str. 263-277.
3. BOURGAUD, F., HEHN, A., LARBAT, R., DOERPER, S., GONTIER, E., KELLNER, S., MATERN, U. *Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes*. *Phytochem Rev.* 2006;5:293-308.
4. HUSSAIN, H., HUSSAIN, J., AL-HARRASI, A., KROHN, K. *The chemistry and biology of bicoumarins*. *Tetrahedron*. 2012;68:2553-2578.
5. HOULT, J. R. S., PAYÁ, M. *Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential*. *Gen Pharmacol.* 1996;27(4):713-722.
6. EGAN, D., O'KENNEDY, R., MORAN, E., COX, D., PROSSER, E., THORNES, D. *The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds*. *Drug Metabol Rev.* 1990;22(5):503-529.
7. <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/Default.asp>; 20. 4. 2014.
8. WIDELSKI, J., POPOVA, M., GRAIKOU, K., GLOWNIAK, K., CHINOU, I. *Coumarins from Angelica lucida L. - Antibacterial Activities*. *Molecules*. 2009;14:2729-2734.

9. DURATE, J., VALLEJO, I., PÉREZ-VIZCAINO, F., JIMÉNEZ, R., ZARZUELO, A., TAMARGO, J. *Effects of visnadine on rat isolated vascular smooth muscles*. *Planta Med.* 1997;63(3):233-236.

10. http://cs.wikipedia.org/wiki/Hlavn%C3%AD_strana; 1. 5. 2014.

11. Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.

12. Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009 – Doplněk 2013*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4679-1.

13. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-HMPC_assessment_report/2013/11/WC500155549.pdf; 6. 7. 2014.

14. SAEED, N., R KHAN, M., SHABBIR, M. *Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts Torilis leptophylla L.* *BMC Complement Altern Med.* 2012;12(221).

15. DUŠEK, J., KAŠPAROVÁ, M., SIATKA, T., SPILKOVÁ, J., TŮMOVÁ, L. *Praktická cvičení z farmakognosie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0598-8. Str. 50-51.

16. DALL'ACQUA, S., LINARDI, M. A., MAGGI, F., NICOLETTI, M., PETITTO, V., INNOCENTI, G., BASSO, G., VIOLA, G. *Natural daucane sesquiterpenes with antiproliferative and proapoptotic activity against human tumor cells*. *Bioorg Med Chem.* 2011;19(19):5876-5885.

17. BASILE, A., SORBO, S., SPADARO, V., BRUNO, M., MAGGIO, A., FARAONE, N., ROSSELI, S. *Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of Ferulago campestris (Apiaceae)*. Molecules. 2009;14:939-952.
18. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Artemisia+capillaris>; 12. 6. 2014.
19. http://www.wikiskripta.eu/index.php/Tvorba_AGEs; 12. 6. 2014.
20. JUNG, H. A., PARK, J. J., ISLAM, M. N., JIN, S. E., MIN, B. S., LEE, J. H., SOHN, H. S., CHOI, J. S. *Inhibitory activity of coumarins from Artemisia capillaris against advanced glycation endproduct formation*. Arch Pharm Res. 2012;35(6):1021-35.
21. DUGAS, D. *Bylinkový receptář*. Praha: Ottovo nakladatelství. 2012. ISBN 978-80-7451-062-5. Str. 115, 127.
22. DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. 3rd ed. New York: Wiley&Sons, 2009. ISBN 978-0-470-74168-9. Str. 129-135.
23. *Physician's Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines*. 3rd Ed., 2004. Montvale (New Jersey): Thomson PDR. ISBN-13 978-1563635120. Str. 875-877.
24. DHINGRA, D., SHARMA, A. *Antidepressant-like activity of Glycyrrhiza glabra L. in mouse models of immobility tests*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006;30(3):449-454.
25. DHANKHAR, Sandeep, RUHIL, S., BALHARA, M., DHANKHAR, Seema, CHHILLAR, A. K. *Aegle marmelos (Linn.) Correa: A potential source of Phytomedicine*. J Med Plants Res. 2011;5(9):1497-1507.

26. SABDE, S., BODIWALA, H. S., KARMASE, A., DESHPANDE, P. J., KAUR, A., AHMED, N., CHAUTHE, S. K., BRAHMBHATT, K. G., PHADKE, R. U., MITRA, D., BHUTANI, K. K., SINGH, I. P. *Anti-HIV activity of Indian medicinal plants*. J Nat Med. 2011;65:662-669.

27. ARBAB, I. A., ABDUL, A. B., ASPOLLAH, M., ABDULLAH, R., ABDELWAHAB, S. I., MOHAN, S., ABDELMAGEED, A. H. A. *Clausena excavata Burm. f. (Rutaceae): A review of its traditional uses, pharmacological and phytochemical properties*. J Med Plants Res. 2011;5(33):7177-7184.

28. LI, W., SUN, Y. N., YAN, X. T., YANG, S. Y., KIM, E., KANG, H. K., KIM, Y. H. *Coumarins and Lignans from Zanthoxylum schinifolium and Their Anticancer Activities*. J Agric Food Chem. 2013;61(45):10730-10740.

29. CONFORTI, F., MENICHINI, G., ZANFINI, L., TUNDIS, R., STATTI, G. A., PROVENZANO, E., MENICHINI, F., SOMMA, F., ALFANO, C. *Evaluation of phototoxic potential of aerial components of the fig tree against human melanoma*. Cell Prolif. 2012;45:279-285.

30. DUDEK-MAKUCH, M., MATŁAWSKA, I. *Coumarins in horse chestnut flowers: isolation and quantification by UPLC method*. Acta Pol Pharm. 2013;70(3):517-522.

31. *Rostlinná medicína*. Praha: Reader's Digest. 2003. ISBN 80-86196-73-9. Str. 87.

32. MANOJLOVIĆ, N. T., MAŠKOVIĆ, P. Z., VASILJEVIĆ, P. J., JELIĆ, R. M., JUSKOVIĆ, M. Ž., SOVRLIĆ, M., MANDIĆ, L., RADOJKOVIĆ, M. *HPLC Analysis, antimicrobial and antioxidant activities of Daphne cneorum L.* Hem Ind. 2012;66(5):709-716.

33. LACY, A., O'KENNEDY, R. *Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer*. Curr Pharm Des. 2004;10:3797-3811.
34. <http://www.biolandes.com/biolandes-photo-gallery.php?lg=en>; 3. 5. 2014.
35. http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/3/lecive_rostliny.html; 14. 7. 2014.
36. <https://gobotany.newenglandwild.org/species/torilis/leptophylla/>; 14. 7. 2014.
37. <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=450>; 15. 7. 2014.
38. http://gernot-katzers-spice-pages.com/engl/Dipt_odo.html; 15. 7. 2014.
39. <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10109>; 14. 6. 2014.
40. <http://anthropogen.com/2008/09/02/bael-fruit-or-wood-apple/>; 16. 8. 2014.
41. <http://www.vivairosariotramontana.it/en/fruttiferi.html>; 24. 8. 2014.
42. <https://www.rhs.org.uk/Plants/5316/Garland-flower-Eximia/Details>; 16. 8. 2014.